



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

FANTO et al.

Atty. Ref.: 2818-93

Serial No. 09/533,381

TC/A.U.: 1621

Filed: March 22, 2000

Examiner: Barts

For: 2-AMINOTETRALINES AND PHARMACEUTICAL
COMPOSITIONS FOR THE PREVENTION AND
THERAPEUTIC TREATMENT OF INFLAMMATORY
AND/OR AUTOIMMUNE PATHOLOGIES

* * * * *

August 11, 2004

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS


It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
RM97A000568	Italy	22 September 1997

Respectfully submitted,

NIXON & VANDERHYE P.C.

By:



Arthur R. Crawford
Reg. No. 25,327

ARC:eaw
1100 North Glebe Road, 8th Floor
Arlington, VA 22201-4714
Telephone: (703) 816-4000
Facsimile: (703) 816-4100

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT



BEST AVAILABLE COPY

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi al brevetto per: **INVENZIONE INDUSTRIALE**
N. 1294931 rilasciato il 23.04.1999

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
conservati dall'ufficio.

li. 29 LUG. 2004

IL FUNZIONARIO

Elena Marinelli

Sig.ra E. MARINELLI

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

marca
da
bollo

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A. N. SP
Residenza ROMA codice 00885531004

2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome _____ cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza _____
via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.
via le Shakespeare n. 0047 città ROMA cap 00144 (prov) RM

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____

gruppo/sottogruppo _____

"Derivati della 2-amminotetralina, procedimento per la loro prepara-
zione e composizioni farmaceutiche che li contengono, attive nella
prevenzione e trattamento di patologie infiammatorie e/o autoimmuni".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☐

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome n.

1) FANTO' Nicola 3) FORESTA Piero
2) MORETTI Gian Piero 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) <u>NESSUNA</u>				
2) _____				

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione _____

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc.	N. es.	PROV	RIS	n. pag.	n. tav.	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 1)	<u>2</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<u>50</u>		
Doc. 2)	<u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare
Doc. 3)	<u>0</u>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4)	<u>1</u>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			designazione inventore
Doc. 5)	<u>0</u>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	<u>0</u>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	<u>0</u>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			nominativo completo del richiedente

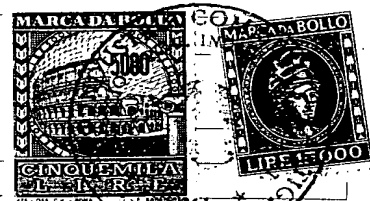
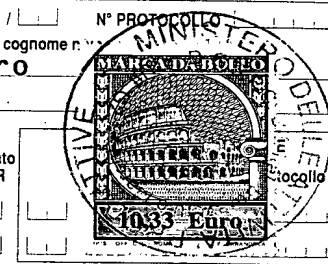
8) attestati di versamento, totale lire

565.000. = (cinquecentosessantacinquemila ==)

obbligatorio

COMPILATO IL 22 09 1997

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

CONTINUA SÌ/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SÌ/NO SÌ

SCIOGLIMENTO RISERVE	
Data	N° Protocollo
____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____
confronta singole priorità	
____/____/____	____/____/____

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

RM 97 A 000568

ROMA

codice 58

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

L'anno millenovecento

novantasette

il giorno

ventidue

del mese di

settembreil (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

S. L'Ufficiale Rogante

RM 97 A 000568

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

RM

000568

REG. A

DATA DI DEPOSITO 22.09.1997

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

Residenza

V.le Shakespeare, 47 - 00144 ROMA

D. TITOLO

Derivati della 2-amminotetralina, procedimento per la loro preparazione e composizioni farmaceutiche che li contengono, attive nella prevenzione e trattamento di patologie infiammatorie e/o autoimmuni.

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Vengono descritti alcuni derivati della 2-amminotetralina, un procedimento per la loro preparazione e composizioni farmaceutiche che li contengono, atte al trattamento di patologie infiammatorie (in particolare dello shock settico) e/o autoimmuni in cui è accertato il ruolo eziopatogenetico di citochine infiammatorie.

M. DISEGNO



La presente invenzione riguarda derivati delle 2-amminotetraline e i loro sali farmacologicamente accettabili, un procedimento per la loro preparazione e composizioni farmaceutiche atte sia al trattamento profilattico e terapeutico dello shock settico che al trattamento di patologie infiammatorie e/o autoimmuni, che
5 verranno definite più dettagliatamente in seguito, in cui è accertato un ruolo eziopatogenetico delle citochine infiammatorie.

2-amminotetraline-6,7-sostituite attive nel trattamento dello shock settico sono già note.

EP-A-0 730861 i cui insegnamenti sono incorporati per riferimento nella
10 presente descrizione descrive una classe di tali 2-amminotetraline-6,7-sostituite e fra queste in particolare la (R,S)-2-ammino-6-fluoro-7-metossitetralina (nel seguito indicata con la sigla ST 626).

Le patologie infiammatorie e/o autoimmuni da trattare con le composizioni della presente invenzione comprendono ad esempio l'artrite reumatoide, la
15 pancreatite, alcune malattie infiammatorie intestinali (ad es. l'inflammatory bowel disease), il lupus eritematoso sistemico, la glomerulonefrite e l'encefalomielite.

Per la sua diffusione e rilievo socio-economico, nel seguito si farà esclusivamente riferimento allo shock settico, fermo restando che anche le altre
20 patologie la cui eziopatogenesi è riconducibile alle citochine infiammatorie vengono efficacemente trattate con i composti della presente invenzione.

Lo shock settico è una sindrome clinica che può insorgere conseguentemente a gravi infezioni sostenute sia da batteri Gram negativi che da batteri Gram positivi, protozoi e virus ed è caratterizzata da leucocitosi, febbre, tachicardia, ipotensione, insufficienza renale, respiratoria, cardiaca ed epatica. Va
25 tuttavia sottolineato come la gravità dello shock settico sia indipendente dal tipo

di microrganismo responsabile della sindrome (Parrillo J. E., Pathogenetic mechanisms of septic shock, *N. Engl. J. Med.*, 328:1471-1477, 1993) e sia piuttosto correlata all'entità della risposta infiammatoria individuale nei confronti dell'agente responsabile dell'insulto tossico.

- 5 Benché negli ultimi anni si sia registrato un significativo miglioramento della terapia antibiotica e dei protocolli di intervento nelle unità di terapia intensiva, lo shock continua a rimanere una delle cause importanti di morbidità e mortalità nel paziente ospedalizzato. Si calcola infatti che negli USA sia responsabile di oltre 100.000 decessi annui (Glauser M. P., Zanetti G., Baumgartner J. D., and Cohen J., Septic shock: pathogenesis, *Lancet*, 338:732-736, 1991).

Lo shock settico trova come momento determinante e qualificante la reazione dell'organismo a prodotti derivanti dalla lisi o dal metabolismo microbico.

- 15 Tra queste sostanze, la prima ad essere individuata e la più utilizzata in ricerche sperimentali è il lipopolisaccaride (LPS), presente nella parete di batteri Gram negativi e costituito chimicamente da una porzione polisaccaridica variabile per le varie specie batteriche e da una lipidica (lipide A) costante, rilevabile in forma micellare nel sangue di soggetti setticemici. Se somministrato all'animale, 20 l'LPS è capace di riprodurre tutta la sintomatologia cardiocircolatoria e neurologica riscontrabile nello shock (Olson N. C., Salzer W. L., McCall C. E., Biochemical, physiological and clinical aspects of endotoxemia, *Molec. Aspects. Med.*, 10:511-629, 1988). Quindi ad esso è attribuibile la qualifica di "primum movens" nella catena di eventi che, attraverso l'attivazione della via intrinseca ed 25 estrinseca della cascata coagulativa e la secrezione di citochine di origine

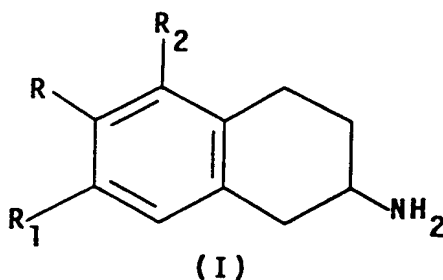
./.

prevalentemente macrofagica-leucocitaria quali TNF, IL-1 e INF- γ (Bone R. C., A critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis, *J.A.M.A.*, **266**:1686-1691, 1991) porta allo scatenamento della sintomatologia clinica.

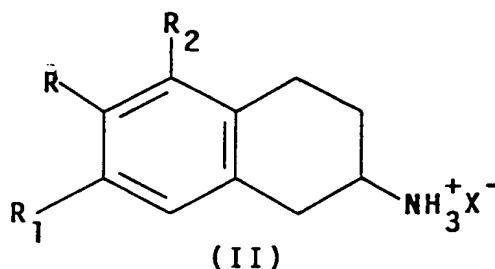
Il crescente rilievo assunto negli ultimi anni da questa patologia, la sua gravità e gli inadeguati presidi terapeutici oggi disponibili rendono auspicabile la rapida scoperta di nuovi agenti terapeutici atti a contrastarne efficacemente la progressione.

E' stato ora trovato che una nuova classe di 2-amminotetraline-6,7-sostituite è potentemente efficace nella prevenzione e nel trattamento delle patologie sopramenzionate.

I derivati delle 2-amminotetraline della presente invenzione possono presentarsi sia sotto forma di basi libere di formula generale (I):



che sotto forma di sali farmacologicamente accettabili di formula (II):



in cui:

R e R₁, uguali o diversi, sono alogeno, in particolare fluoro; ossidrilile;

alcossi C1-C4, in particolare metossi, eventualmente sostituito in posizione ω con gruppi OH, NH₂, NR₃R₄, dove R₃ e R₄, uguali o diversi, sono H, alchile C1-C4, non sostituito o sostituito in posizione ω con i gruppi OH, NH₂;

5

alcanoile C1-C4, in particolare acetile;

alchile C1-C4; carbamoile; carbamoilossi; ammino;

ammino sostituito NR₃R₄, dove R₃ e R₄ hanno i significati precedentemente descritti;



- 10 R₂ è idrogeno; alogeno, in particolare fluoro; ossidrile; metossi, con la condizione che venga escluso il caso in cui la 2-amminotetralina è un racemo in cui (a) R = R₁ = CH₃O; OH; R₂ = H; oppure (b) R = F; R₁ = CH₃O; OH; R₂ = H; e

X⁻ è l'anione monovalente di un acido farmacologicamente accettabile.

- 15 Per sale farmacologicamente accettabile di composti di formula (II) si intende qualsiasi sale di questi con un acido che non dia origine ad indesiderati effetti tossici o collaterali. Tali acidi sono ben noti ai farmacologi ed agli esperti di tecnologia farmaceutica.

- 20 Esempi non limitativi di tali sali sono ad esempio cloruro, bromuro, orotato, aspartato acido, citrato acido, fosfato acido, fumarato e fumarato acido, lattato, maleato e maleato acido, ossalato acido, solfato acido, glucosio fosfato, tartrato e tartrato acido. Un elenco di sali approvati dalla FDA è riportato in Int. J. Of Pharm. 33, (1986), 201-217, pubblicazione che è incorporata per riferimento nella presente descrizione.

Esempi preferiti di composti specifici secondo la presente invenzione sono:

- 25 S(-)-2-ammino-6-fluoro-7-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1237);

./.

R(+)-2-ammino-6-fluoro-7-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1238);

(R,S)-2-ammino-5,6-difluoro-7-metossi-tetralina cloridrato (ST 1269);

(R,S)-2-ammino-6-fluoro-7-metil-tetralina cloridrato (ST 1275);

(R,S)-2-ammino-7-fluoro-6-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1267);

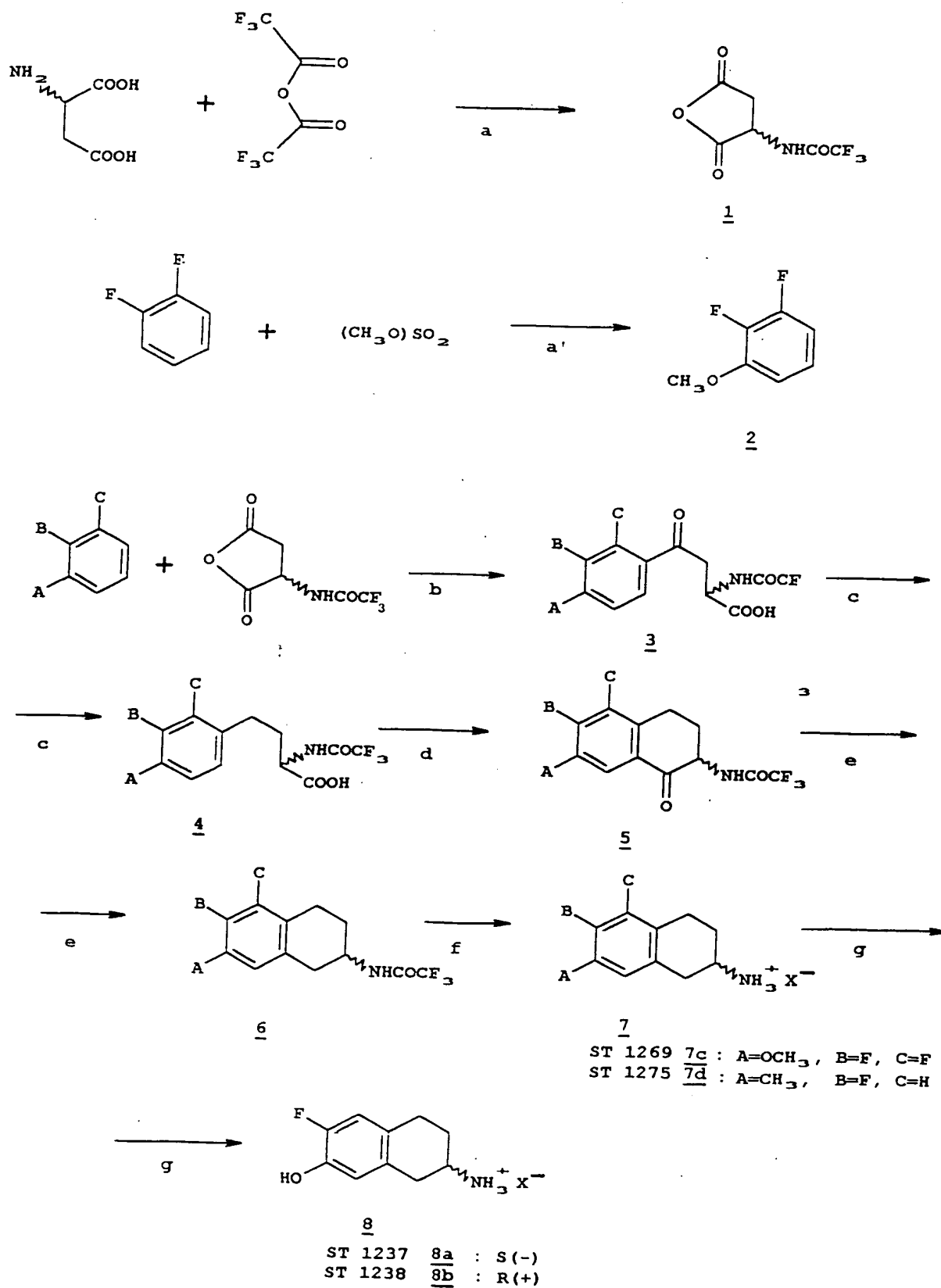
5 (R,S)-7-acetil-2-ammino-6-metil-tetralina cloridrato (ST 1274);

(R,S)-2-ammino-7-fluoro-6-metossi-tetralina cloridrato (ST 1262);

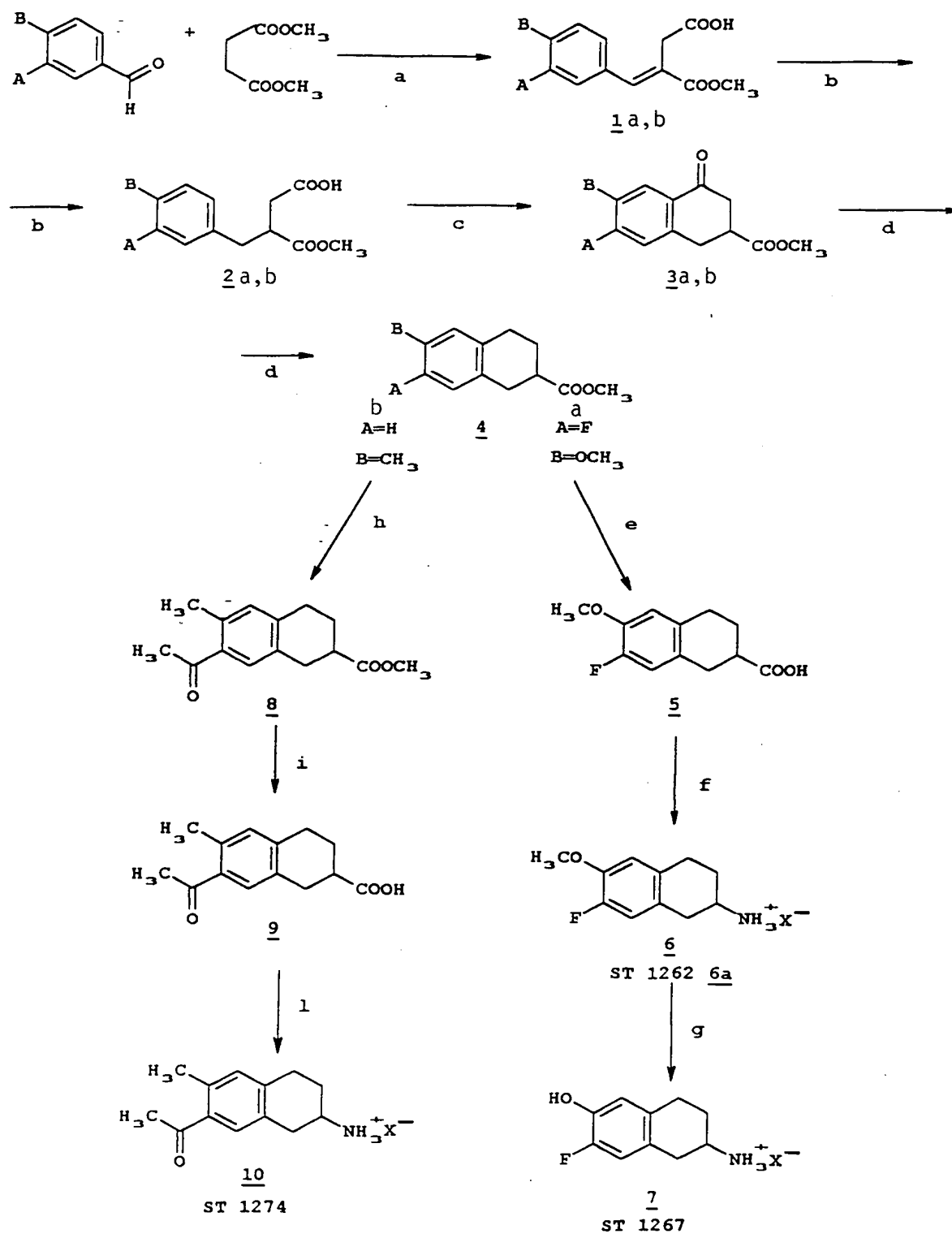
Il procedimento per la preparazione dei composti secondo l'invenzione sotto forma di base libera o di sale farmacologicamente accettabile è rappresentato dai seguenti schemi di reazione:

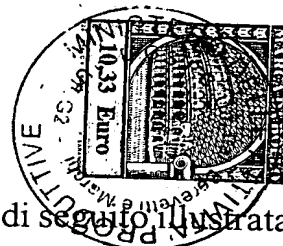
10

SCHEMA 1



SCHEMA 2





Con riferimento ai precedenti schemi di reazione, viene di seguito illustrata la preparazione di alcuni composti secondo l'invenzione sotto forma di cloridrato ($X=Cl^-$)

ESEMPIO 1 (Schema 1)

5 Preparazione della S(-)-2-ammino-6-fluoro-7-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1237) 8a

a) Preparazione dell'anidride S(-)-trifluoroacetil-aspartica 1a

Si sospese l'acido L(+)-aspartico (100 g)(0.75 moli) in acido trifluoroacetico (300 ml), si mise sotto agitazione e si raffreddò a $-20^{\circ}C$ con bagno a ghiaccio e sale. Quindi venne aggiunta lentamente sotto agitazione l'anidride trifluoroacetica (300 ml) (2.16 moli). Terminata l'aggiunta si scaldò cautamente a ricadere a $45^{\circ}C$ per una notte.

Al termine della reazione la soluzione venne portata completamente a secco all'evaporatore e sul solido residuo si fecero tre lavaggi con esano sotto agitazione decantando l'esano ogni volta; poi si tirò di nuovo completamente a secco. Si triturrò infine il residuo sotto agitazione con esano-etere etilico, si filtrò e si essiccò sotto vuoto. Si ottennero 150 g (resa 95%).

P.F.: $140-2^{\circ}C$

$[\alpha]_D = -40.7^{\circ}$ (c = 1% metanolo)

20 1H -NMR(DMSO d_6), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 2,85-3,3 (2H,m,CH $_2$); 4,95-5,1(1H,m,CHNH); 9,6-9,8 (1H,bd,CHNHCOCF $_3$).

b) Preparazione dell'acido S(+)-4-(3-fluoro-4-metossifenil-4-oxo-2-(N-trifluoroacetil)-amminobutanoico 3a

Si sospese l'anidride S(-)-trifluoroacetil-aspartica (150 g) (0.712 moli) nel 2-fluoroanisolo (300 ml) (2.67 moli), si mise sotto vigorosa agitazione e poi si

./.

aggiunse lentamente a piccole porzioni il cloruro di alluminio anidro (240 g: 1.57 moli). Terminata l'aggiunta si tenne sotto vigorosa agitazione a 40-45°C per 24 ore.

5 Poi venne aggiunto CH_2Cl_2 anidro, altri 60 g di AlCl_3 e la reazione venne tenuta sotto agitazione per altre 48 ore.

Al termine il residuo solido venne trattato con 1 litro di CH_2Cl_2 , macinandolo sotto agitazione. Il cloruro di metilene contenente il fluoro anisolo in eccesso venne separato. Il solido residuo, filtrato venne aggiunto a porzioni a 2 litri di HCl 6 M tenuto sotto vigorosa agitazione. Al termine dell'aggiunta si
10 tenne sotto agitazione per 30 minuti. Successivamente la fase acida venne ripetutamente estratta con etere etilico. Le fasi eterree vennero riunite, lavate con acqua, essiccate su Na_2SO_4 anidro e poi tirate a secco. Si ottenne un residuo solido grezzo che venne cristallizzato da AcOEt /esano 1 : 1. Si ottennero 188 g (resa 78%).
P.F.: 113-5°C

15 $[\alpha]_D = +27.5^\circ$ (c = 1% metanolo)

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$, Varian 300 MHz, $\delta(\text{p.p.m.})$: 3,6 (2H,m,CH NH); 3,96(3H,s,PhOCH₃); 4,88-5,01 (1H,m,CH₂ CHNH); 7,18-7,22 (1H,t,Ar); 7,7-7,8(1H,dd,Ar); 7,82-7,9(1H,bd,Ar).

20 c) Preparazione dell'acido S(+)-4-(3-fluoro-4-metossifenil)-2-(N-tri-fluoro-acetil)amminobutanoico 4a

Il composto 3a (100 g) (0.297 moli) venne sciolto in acido trifluoroacetico (500 ml). La soluzione venne raffreddata a 0°C e si aggiunse lentamente il trietilsilano (300 ml) (1,89 moli). Terminata l'aggiunta si portò lentamente all'ebollizione per 4 ore.

25 Al termine si tirò completamente a secco all'evaporatore e si fecero due

./.

lavaggi con etere etilico tirando a secco ogni volta per eliminare completamente l'acido trifluoroacetico. L'olio residuo venne raffreddato a -20°C con bagno a ghiaccio e sale e poi venne trattato sotto agitazione con una soluzione satura di NaHCO_3 portata a pH 10 con NaOH 4N. La fase alcalina finale venne cautamente

5 acidificata a 0°C sino a $\text{pH} = 3$ con HCl 6N. Precipitò il prodotto che venne estratto con CH_2Cl_2 più volte. Gli estratti organici vennero riuniti, lavati con poca acqua, essiccati su Na_2SO_4 anidro e tirati a secco. L'olio residuo venne sciolto in poco acetato di etile e precipitato con esano sotto agitazione. Si lasciò una notte sotto agitazione e poi si filtrò e si essiccò. Si ottennero 72 g (resa 75%).

10 P.F.: $113-5^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D = +11.3^{\circ}$ ($c = 1\%$ metanolo) analisi: conformi.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$, Varian 300 MHz, $\delta(\text{p.p.m.})$: 2,0-2,18 (1H,m, CHHCHNH); 2,22-2,36 (1H,m, CHHCHNH); 2,6-2,7(2H,t, PhCH_2CH_2); 3,84(3H,s, PhOCH_3); 4,6-4,7(1H,m, CH_2CHNH); 6,78(1H,bd, CHNHCOCF_3); 6,8-6,92(2H,m,Ar).

15 d) Preparazione di S(-)-2-(N-trifluoroacetil)ammino-6-fluoro-7-metossi-1-tetralone 5a

Il prodotto 4a (70 g) (0.217 moli) venne sciolto in cloruro di metilene anidro (1400 ml) si raffreddò a 0°C con bagno a ghiaccio e quindi si aggiunse lentamente un po' alla volta il pentacloruro di fosforo (70 g: 0.336 moli).

20 Terminata l'aggiunta si tenne sotto agitazione a 0°C per 2 ore circa quindi si raffreddò a -20°C e si aggiunse a piccole porzioni tricloruro di alluminio (56 g; 0.42 moli).

Terminata l'aggiunta si tenne per circa 2 ore a temperatura ambiente e poi si scaldò cautamente all'ebollizione per 6 ore circa.

25 Al termine si raffreddò a 0°C e si aggiunse sotto agitazione un pò alla volta

./.

ghiaccio triturato (circa 300 mL) per distruggere l'eccesso di reattivi. La miscela venne estratta 3 volte con CH_2Cl_2 . Le fasi organiche vennero riunite essiccate su Na_2SO_4 e tirate a secco. Si ottenne un solido giallastro che venne sciolto con poco acetato di etile e poi riprecipitato con esano.

5 Si ottennero 40 g (resa 60 %).

P.F.: 184-185°C

$[\alpha]_D = -55.4^\circ$ (c = 1% metanolo)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,83-2,2 (1H,m, CHHCHNH); 2,8-2,88 (1H,m, CHHCHNH); 2,9-3,0 (1H,m, CHHCH_2); 3,15-2,26 (1H,m, CHHCH_2);
10 3,92(3H,s, PhOCH_3); 4,53-4,62 (1H,m, $\text{CH}_2\text{CHNHCOCF}_3$); 6,88 (1H,d,Ar.); 7,57 (1H,d,Ar.); 7,43 (1H,bs, CHNHCOCF_3).

e) Preparazione di S(-)-2-(N-trifluoroacetil)ammino-6-fluoro-7-metossitetralina
6a

15 Il prodotto 5a (40 g) (0.131 moli) venne sospeso in trifluoruro di boro eterato (340 ml) alla temperatura di 0°C.

Si aggiunse trietilsilano (90 ml) (0.567 moli) a 0°C e si tenne sotto agitazione per circa 4 giorni a temperatura ambiente. Al termine della reazione si aggiunse una soluzione satura di NaHCO_3 (pH 8-9) e la fase acquosa venne estratta per 4 volte con CH_2Cl_2 . Le fasi organiche riunite vennero lavate con acqua,
20 essiccate su Na_2SO_4 anidro filtrate e tirate a secco. Il grezzo ottenuto venne ricristallizzato da etere isopropilico.

Si ottennero 30 g (resa 78%).

P.F.: 45-7°C

$[\alpha]_D = -80^\circ\text{C}$ (c = 1% metanolo)

25

./.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$, Varian 300 MHz, δ (p.m.): 1,78-1,9 (1H,m, CHHCNNH); 2,0-2,15 (1H,m, CHHCHNH); 2,6-2,72 (1H,dd, PhCHHCHNH); 2,73-2,9 (2H,m, PhCHHCHNH , PhCHHCH_2); 3,03-3,15 (1H,dd, PhCHHCH_2) 4,2-4,35 (1H,m, CHNH); 6,38 (1H,bd, CHNHCOCF_3); 6,6 (1H,d,Ar); 6,8 (1H,d,Ar).

5 f) Preparazione di S(-)-2-ammino-6-fluoro-7-metossitetralina cloridrata 7 a

Il prodotto 6a (30 g) (0.103 moli) venne sciolto in metanolo (225 ml) e H_2O (225 ml) contenente K_2CO_3 (54 g) (0.391 moli).

La soluzione venne tenuta a ricadere sotto agitazione per 3 ore.

10 Il metanolo venne allontanato sotto vuoto e si aggiunsero altri 100 ml di H_2O . La fase acquosa venne estratta ripetutamente con CH_2Cl_2 . Le fasi organiche vennero riunite, essiccate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e tirate a secco. Il solido oleoso così ottenuto venne sciolto in etere etilico acidificato con HCl (sol. al 15% in etanolo) ed il solido precipitato venne filtrato e poi ridisciolti in metanolo, decolorato con carbone attivo, filtrato, concentrato sotto vuoto ed infine
15 cristallizzato da n-propanolo.

La cristallizzazione venne ripetuta 2 volte, ottenendo il composto.

Si ottennero 12.6 g (resa 53%).

P.F.: 263-265°C

$[\alpha]_D = -52.5^\circ$ (c = 1% H_2O)

20 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$, Varian 300 MHz, δ ppm): 1,6-1,8 (1H, m, CHHCHN^+); 2,0-2,15(1H,,m, CHHCHN^+); 2,6-2,75 (3H,m, PhCHHCHN^+ , PhCH_2CH_2); 2,95-3.05 (1H,DD, PhCHHCHN^+); 3,45-3,55 1H, m, CHN^+); 6,7-6,7(2H,m,Ar).

g) Preparazione della S(-)-2-ammino-6-fluoro-7-idrossi tetralina cloridrato (ST 1237) 8a

25 Venne scaldata a ricadere per una notte una soluzione di 3 g (0.13 moli) di



S(-)-2-ammino-6-fluoro-7-metossitetralina cloridrato 7a in 20 ml di acido bromidrico al 47% in acqua.

Al termine la soluzione venne concentrata sotto vuoto a secchezza ed il residuo ripetutamente lavato con acetone sotto agitazione e filtrato, sciolto in una miscela acqua/metanolo 1 : 1 e fatto eluire su una colonna riempita con 60 ml di resina Amberlyst A 21 attivata in forma basica.

L'eluato venne acidificato con acido cloridrico 2N e poi concentrato sotto vuoto a secchezza, il residuo lavato con acetone, filtrato, sciolto di nuovo in acqua/metanolo 1 : 1 e fatto eluire su una colonna riempita con 60 ml di resina Amberlyst A 21 attivata in forma cloridrata.

L'eluato venne decolorato con carbone attivo, filtrato su celite, concentrato a piccolo volume. Per aggiunta di acetone alla soluzione si formò un precipitato che venne filtrato ed essiccato in stufa sotto vuoto.

Si ottennero 2,2 g (resa 78%).

P.F.: 259-261 °C

$[\alpha]_D = -55.4$ (c = 1% H₂O)

¹H-NMR (D₂O), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1.6-1.8 (1H, m, CH₂ CHHCHN⁺); 2,0-2,1 (1H, m, CH₂CHHCHN⁺); 2,5-2,7 (3H, m, PhCH₂CH₂), PhCHHN⁺); 2.85-3,0 (1H, m, PhCHHN⁺); 3,4-3,55 (1H, m, CHN⁺); 6,55-6,8 (2H, 2d, Ar.).

20 **ESEMPIO 2 (Schema 1)**

Preparazione della R(+)-2-ammino-6-fluoro-7-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1238) 8b

a) **Preparazione della R(+)-trifluoroacetil-aspartica 1b**

La preparazione è analoga a quella dell'anidride S(-)-trifluoro-acetil-aspartica 1a usando come prodotto di partenza l'acido D(-) aspartico (resa 86%).

./.

P.F.: 142-144°C

$[\alpha]_D = +40.0$ (c = 1% metanolo)

¹H-NMR: conforme e coincidente a quello del prodotto 1a

5 **b) Preparazione dell'acido R(-)-4-(3-fluoro-4-metossifenil)-4-oxo-2-(N-trifluoroacetil)amminobutanoico 3b**

La preparazione è analoga a quella dell'acido S(+) 4-(3-fluoro-4-metossifenil)-4-oxo-2(N-trifluoroacetil)ammino butanoico 3a usando come prodotto di partenza l'anidride 1b (resa 57%).

P.F.: 86-88°C

10 $[\alpha]_D = -28.0$ (c = 1% metanolo)

¹H-NMR: conforme e coincidente a quello del prodotto 3a

c) Preparazione dell'acido R(-)-4-(3-fluoro-4-metossifenil)-2-(N-trifluoroacetil)amminobutanoico 4b

15 La preparazione è analoga a quella dell'acido S(+) 4-(3-fluoro-4-metossifenil)-2(N-trifluoroacetil)ammino butanoico 4a usando come prodotto di partenza l'acido 3b (resa 65%).

P.F.: 110-112°C

$[\alpha]_D = -11,2$ (c = 1% metanolo)

¹H-NMR: conforme e coincidente a quello del prodotto 4a

20 **d) Preparazione dell'acido R(+)-2-(N-trifluoroacetil)ammino-6-fluoro-7-metossi-1-tetralone 5 b**

La preparazione è analoga a quella dell'acido S(-)-2-(N-trifluoroacetil)ammino-6-fluoro-7-metossi-1-tetralone 5a usando come prodotto di partenza l'anidride 4 b (resa 84%).

25 P.F.: 185-186°C

$[\alpha]_D = + 66.0$ (c = 1% metanolo)

$^1\text{H-NMR}$: conforme e coincidente a quello del prodotto 5a

e) Preparazione dell'acido R(+)-2-(N-trifluoroacetil)-ammino-6-fluoro-7-metossi-tetralina 6 b

5 La preparazione è analoga a quella dell'acido S(-)-2(N-trifluoroacetil)ammino-6-fluoro-7-metossitetralina 6a usando il tetralone 5b come prodotto di partenza (resa 47%).

P.F.: 145-147°C

$[\alpha]_D = + 92.0$ (c = 1% metanolo)

10 $^1\text{H-NMR}$: conforme e coincidente a quello del prodotto 6a

f) Preparazione della R(+)-2-ammino-6-fluoro-7-metossi-tetralina cloridrato 7 b

La preparazione è analoga a quella della S(-)-2-ammino-6-fluoro-7-metossitetralina cloridrato 7a usando la tetralina 6 b come prodotto di partenza. (resa 64%)

P.F.: 260-262°C

15 $[\alpha]_D = + 48.5$ (c = 1% H²O)

$^1\text{H-NMR}$: conforme e coincidente a quello del prodotto 7a

g) Preparazione dell'R(+)-2-ammino-5-fluoro-7-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1238) 8b

20 La preparazione è analoga a quella della S(-)-2-ammino-5-fluoro-7-idrossitetralina cloridrato (ST 1237) 8a usando la tetralina cloridrato 7b come prodotto di partenza (resa 78%).

P.F.: 260-262°C

$[\alpha]_D = + 55,0$ (c = 1% H₂O)

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,6-1,8($1\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{CHHCHN}^+$); 2,0-2,1 ($1\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{CHHCHN}^+$); 2,5-2,7($3\text{H}, \text{m}, \text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{PhCHHCHN}^+$); 2,85-3,0($1\text{H}, \text{m}, \text{PhCHHCHN}$); 3,4-3,55($1\text{H}, \text{m}, \text{CHN}^+$); 6,55-6,8($2\text{H}, 2\text{d}, \text{Ar}$).

ESEMPIO 3 (Schema 1)

5 Preparazione del (R,S)-2-ammino-5,6-difluoro-7-metossi-tetralina cloridrato (ST 1269) 7c

a) Preparazione dell'anidride (R,S)-trifluoroacetil-aspartica 1c

La preparazione è analoga a quella dell'anidride S(-)-trifluoroacetil-aspartica 1a usando l'acido (D,L)-aspartico come prodotto di partenza (resa 96%).

10 P.F.: 133-134°C

$^1\text{H-NMR}$: conforme e coincidente a quello del prodotto 1a.

a') Preparazione del 2,3-difluoroanisolo 2

15 Vennero salificati 20 g (0.154 moli) di 2,3-difluorofenolo trattando a temperatura ambiente il prodotto in una soluzione di 6,24 g di soda in 60 ml di acqua fino a completa solubilizzazione.

Vennero aggiunti alla soluzione raffreddando a circa 10°C lentamente 14,4 ml di solfato dimetilico, quindi la soluzione venne scadata a ricadere per un giorno e una notte.

20 Dopo aver portato a temperatura ambiente la soluzione di reazione venne estratta con cloruro di metilene e quindi la fase organica lavata con acqua, acido solforico N e ancora acqua fino a neutralità.

La soluzione venne anidrificata con solfato sodico anidro e il solvente eliminato per evaporazione sotto vuoto ottenendo 21 g di un olio rossiccio che venne analizzato al NMR ed utilizzato come grezzo. Resa sul grezzo 94%.

25

./.



$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) Varian 300 MHz δ (p.p.m.): 3,9 (3H, S, PhOCH_3); 6,6-7,2 (3H, m, aromatici).

b) Preparazione dell'acido (R,S) 4-(2,3-difluoro-4-metossifenil)-4-oxo-2(N-trifluoroacetil)amminobutanoico 3c

5 La preparazione è analoga a quella dell'acido S(+) 4-(3-fluoro-4-metossifenil)-4-oxo-2(N-trifluoroacetil)ammino butanoico 3a usando come prodotti di partenza l'anidride 1c e il 2,3-difluoroanisolo 2 e 72 ore di tempo di reazione invece di 48 ore. Resa 23%.

10 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 3,45-3,7 (2H, m, CH_2CHNH); 3,97(3H, S, PhOCH_3); 4,95-5,05(1H, m, CH_2CHNH); 7,0-7,1 (1H, bt, Ar); 7,68-7,78(1H, bt, Ar).

c) Preparazione dell'acido (R,S)-4-(2,3-difluoro-4-metossifenil)-2-(N-trifluoroacetil)amminobutanoico 4c

15 La preparazione è analoga a quella dell'acido S(+)-4-(3-fluoro-4-metossifenil)-2-(N-trifluoroacetil) amminobutanoico 4a usando come prodotto di partenza l'acido 3c. Resa 76%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 2,0-2,2 (1H, m, CHHCHN^+) 2,2-2,4 (1H, m, CHHCHCN); 2,6-2,8 (2H, t, PhCH_2CH_2); 3,86 (3H, S, PhOCH_3); 4,6-4,72 (1H, bq, CH_2CHNH); 6,6-6,7 (1H, bt, Ar); 6,75-6,88 (2H, m, Ar, CHNHCOCF_3).

20 d) Preparazione del (R,S)-2-(N-trifluoroacetil) ammino-5,6-difluoro-7-metossi-1-tetralone 5c

25 La preparazione è analoga a quella del S(-)(N-trifluoroacetil) ammino-6-fluoro-7-metossi-1-tetralone 5a usando come prodotto di partenza l'acido 4c e tre ore come tempo di reazione a ricadere dopo l'aggiunta di tricloruro di alluminio invece di 6 ore (resa 26%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,85-2,0 (1H, m, CHHCHN^+) 2,84-3,07 (2H,m, CHHNH , PhCHHCH_2); 3,13-3,24 (1H,m, PhCHHCH_2); 3,93 (1H,s, PhOCH_3); 4,55-4,65 (1H,m, CH_2CHNH) ; 7,38-7,42 (1H,dd,Ar); 7,43- (1H,bs,, CHNHCOCF_3).

5 e) Preparazione del (R,S)-2-(N-trifluoroacetil)ammino-5,6-difluoro-7-metossitetralina 6 c

La preparazione è analoga a quella del S(-)(N-trifluoroacetil) ammino-6-fluoro-7-metossitetralina 6a dall'esempio 1) usando il tetralone 5 c come prodotto di partenza e 7 giorni come tempo di reazione invece di quattro (resa 46%).

10 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,75-1,9 (1H, m, CHHCHN^+) 2,04-2,16 (2H,m, CHHCHNH); 2,6-2,9 (3H,m, PhCH_2CHNH , PhCHHCH_2); 3,05-3,15 (1H,dd, PhCHHCH_2); 3,84 (3H,s, PhOCH_3); 4,2-4,33 (1H,m, CHNHCOCF_3); 6,22 (1H,bs, CHNHCOCF_3); 6,9-6,94(1H,bd,Ar).

15 f) Preparazione del (R,S)-2-ammino-5,6-difluoro-7-metossi-1-tetralina cloridrato (ST 1269) 7 c

La preparazione è analoga a quella della S (-)-2- ammino-6-fluoro-7-metossitetralina cloridrato 7a usando come prodotto di partenza la tetralina 6c e isopropanolo come solvente di cristallizzazione (resa 62%).

P.F.: decompone a 210°C

20 $^1\text{H-NMR}$ (D_2O), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,6-1,8(1H, m, CHCHHCHN^+) 2,0-2,2 (1H,m, $\text{CH}_2\text{CHHCHN}^+$, 2,5-2,9 (3H,m, PhCHHCHN^+ , PhCH_2CH_2); 2,9-3,1 (1H,m, PhCHCHN^+); 3,4-3,6 (1H,m, CHN^+); 6,5-6,6(1H,d,Ar).

ESEMPIO 4 (Schema 1)**Preparazione del (R,S)-2-ammino-6-fluoro-7-metil-tetralina cloridrato (ST 1275) 7d****a) Preparazione dell'anidride (R,S)-trifluoroacetil aspartica 1c**

5 (vedi esempio 3)

b) Preparazione dell'acido (R,S)-4-(3-fluoro-4-metil-fenil)-4-oxo-2-(N-trifluoroacetil) ammino butanoico 3d

10 La preparazione è analoga a quella dell'acido S(+)-4-(3-fluoro-4-metossifenil)-4-oxo-2-(N-trifluoroacetil)ammino butanoico 3a usando il fluorotoluene come prodotto di partenza e 72 ore come tempo di reazione invece di 48 ore (resa 36%).

¹H-NMR (CDCl₃) Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 2,15 (3H, d, PhCH₃); 3,35-3,42 (1H,dd,CH₂CHNH); 3,5-3,6(1H,dd,CH₂CHNH); 4,68-4,76 (1H,m,CH₂CHNH); 6,85-6,95 (1H,t,Ar); 7,55-7,65 (2H,m,Ar); 8,0-8,1(1H,bd,CHNHCOCF₃).

c) Preparazione dell'acido (R,S)-4-(3-fluoro-4-metil-fenil)-2-(N-trifluoroacetil)ammino butanoico 4d

La preparazione è analoga a quella dell'acido S(+)-4-(3-fluoro-4-metossifenil)-2-(N-trifluoroacetil)ammino butanoico 4a usando l'acido 3d come prodotto di partenza (resa 52%).

20 ¹H-NMR (CDCl₃) Varian 200 MHz, δ (p.p.m.): 2,15 (3H, d, PhCH₃); 2,0-2,4 (2H,dd,CH₂CHNH); 2,5-2,7(2H,t,PhCH₂CH₂); 4,5-4,7 (1H,bq,CH₂CHNH); 6,6-6,7 (1H,m,Ar); 6,75-6,95 (2H,m,Ar); 7,35-7,5(1H,bd,CHNHCOCF₃).

d) Preparazione dell'acido (R,S)-2-(N-trifluoro-acetil)-ammino-6-fluoro-7-metil-1-tetralone 5d

25 La preparazione è analoga a quella dell'acido S(-)-2-(N-

./.

trifluoroacetil)ammino-6-fluoro-7-metossi-1-tetralone 5a, usando l'acido 4d come prodotto di partenza e 1 ora a riflusso invece di 2 ore a temperatura ambiente e 6 ore a riflusso come tempi di reazione dopo l'aggiunta del tricloruro di alluminio (resa 80%).

- 5 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,83-2,0 (1H, d, CHHCHNH); 2,3- (3H,d, PhCH_3); 2,8-2,9(1H,m, CHHCHNH); 2,92-3,03 (1H,m, CHHCH); 3,13-3,25(1H,m, CHHCH_2); 4,53-4,62 (1H,m, CHCHNHCOCF_3); 7,2(1H,d,Ar); 7,6(1H,d,Ar); 7,45(1H,bs, CHNHCOCF_3).

e) Preparazione della (R,S)-2-(N-trifluoroacetil)ammino-6-fluoro-7-metiltetralina

10 6d

La preparazione è analoga a quella della S(-)-2-(N-trifluoroacetil)ammino-6-fluoro-7-metossitetralina 6a, usando il tetralone 5d come prodotto di partenza (resa 60%).

- 15 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,75-1,9 (1H, m, CHHCHNH); 2,0-2,15 (1H,m, CHHCHNH); 2,2(3H,s, PhCH_3); 2,6-2,7 (1H,dd, PhCHHCHNH); 2,7-2,9 (2H,m, PhCHHCHNH , PhCHHCH_2); 3,03-3,15(1H,dd, PhCHHCH_2) 4,25-4,35 (1H,m, CHNH); 6,2 (1H,b,s, NHCOCF_3); 6,7(1H,d,Ar); 6,9 (1H,d,Ar).

f) Preparazione della (R,S)-2-(ammino-6-fluoro-7-metiltetralina cloridrato (ST 1275) 7d

- 20 La preparazione è analoga a quella della S(-)-2-ammino-6-fluoro-7-metossitetralina cloridrato 7a, usando la tetralina 6d come prodotto di partenza (resa 67%).

P.F.: decompone a 230°C

25



$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,7-1,9 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CHHCHN}^+$); 2,15-2,25 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CHHCHN}^+$); 2,19 (3H, s, PhCH_3); 2,7-2,9 (3H, m, PhCHNH^+ , PhCH_2CH_2); 3,05-3,6 (1H, m, PhCHHCHN^+); 3,45-3,6 (1H, m, CHNH_3^+); 6,75-6,8 (1H, d, Ar); 6,95-7,0 (1H, d, Ar).

5 ESEMPIO 5 (Schema 2)

Preparazione della (R,S)-2-ammino-6-metossi-7-fluoro-tetralina cloridrato (ST 1262) 6a

a) Preparazione dell'acido 4-(6-metossi-7-fluorofenil)-3-carbometossi-3-butenico 1a

10 Vennero disciolti in 15 ml di metanolo anidro 9,4 g (0,061 moli) di 3-fluoro-p-anisaldehyde e 10 g (0,068 moli) di dimetil succinato. La soluzione venne gocciolata a temperatura ambiente ad una soluzione precedentemente preparata con 1,66 g (0,073 moli) di sodio metossido. La miscela di reazione venne scaldata a leggero riflusso sotto corrente di azoto per tre ore, quindi raffreddata e
15 concentrata a metà volume sotto vuoto.

La soluzione così ottenuta venne acidificata con HCl 2N raffreddando con bagno di ghiaccio, quindi diluita con acqua fino a precipitazione del prodotto che venne filtrato e risolto in soluzione satura di bicarbonato sodico. La soluzione acquosa venne quindi dibattuta con etere etilico più volte ed acidificata di nuovo
20 con HCl 2N raffreddando con ghiaccio.

Il prodotto venne estratto dalla soluzione acquosa più volte con acetato di etile, la soluzione organica anidrificata con solfato di sodio anidro ed il solvente eliminato sotto vuoto ottenendo il prodotto solido che, cristallizzato da una miscela di acetato di etile e n-esano dopo essiccamento fornì 5,5 g dell'acido 1a
25 (resa 33%).

./.

P.f.: 141-144°C

¹H-NMR (CDCl₃), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.) : 3,55 (2H,s,CH₂ COOH); 3,83 (3H,s,COOCH₃); 3,9(3H,s,PhOCH₃); 6,95-7,2 (3H,m,Ar); 7,8 (1H,s,CH=C).

5 **b) Preparazione dell'acido (R,S)-4-(6-metossi-7-fluorofenil)-3-carbometossi**
butanoico 2a

10 Vennero sciolti in 80 ml di acetato di etile 2 g (0,0075 moli) dell'acido 4-(6-metossi-7-fluorofenil)-3-carbometossi-3-butenico 1 a e quindi idrogenati in Parr con 200 mg di palladio su carbone ad una pressione di 55 p.s.i. per un'ora e mezza. Venne filtrato su celite il catalizzatore e il solvente eliminato sotto vuoto ottenendo 1,9 g di un olio che cristallizza spontaneamente (resa 93%).

¹H-NMR (CDCl₃), Varian 200 MHz, δ (p.p.m.) 2,3-2,45 (1H,m,CHCOOCH₃); 2,5-2,75 (2H, m, CH₂COOH); 2,8-3,1 (2H,m,PhCH₂); 3,6 (3H,s,COOCH₃); 3,8 (3H,s,PhOCH₃); 6,75-6,9(3H,m,Ar)

15 **c) Preparazione dell'estere etilico dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-4-oxo-**
1,2,3,4 -tetraidro-2-naftoico 3 a

20 Vennero solubilizzati in 100 ml di cloruro di metilene anidro 5,6 g (0,021 moli) dell'acido (R,S)-4-(6-metossi-7-fluorofenil)-3-carbometossi-butanoico 2a, alla soluzione si aggiunsero 5 g (0,024 moli) di pentacloruro di fosforo mantenendo la temperatura a 0°C per 45 minuti. Vennero aggiunti 3,6 g (0,027 moli) di triclورو di alluminio dopo aver portato la temperatura a -10°C, la temperatura fu lasciata salire spontaneamente in 40 minuti a 20°C, quindi si scaldò a riflusso per un'ora.

25 Il solvente venne eliminato per evaporazione sotto vuoto, vennero aggiunti 100 ml di acqua ghiacciata e la sospensione venne estratta con 150 ml di acetato di etile con tre estrazioni, la soluzione organica venne anidrificata su solfato

./.

sodico anidro ed il solvente eliminato per evaporazione sotto vuoto. Si ottennero quindi 4,3 g di prodotto solido (resa 81%).

¹H-NMR (CDCl₃), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 2,7-2,95 (2H,m,PhCH₂); 3,1-3,22 (3H,m,PhCOCH₂,CHCOOCH₃); 3,7 (3H,s,COOCH₃); 3,9 (3H,s,PhOCH₃); 6,95 (1H,d,Ar); 7,6 (1H,d,Ar)

d) Preparazione dell'estere metilico dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 4 a

Vennero sciolti 6 g (0,024 moli) dell'estere metilico dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-4-oxo-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 3a in una miscela di 100 ml di etanolo anidro e 50 ml di acido acetico glaciale, questa soluzione venne messa in Parr con 800 mg di palladio su carbone sotto 50 p.s.i. di pressione di idrogeno per quattro ore.

Venne filtrato su celite il catalizzatore ed il solvente eliminato sotto vuoto ottenendo 5,5 g di prodotto solido (resa 98%).

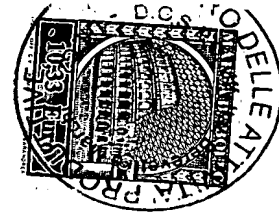
¹H-NMR (CDCl₃), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,75-1,9 (1H,m,CHHCHCOOCH₃); 2,1-2,22(1H,m,CHHCHCOOCH₃); 2,6-2,8 (3H,m,PhCH₂CHCOOCH₃, CHCOOCH₃); 2,9 (2H,d,PhCH₂CH₂); 3,7 (3H,s,COOCH₃); 3,83 (3H,s,PhOCH₃); 6,62 (1H,d,Ar); 6,78 (1H,d,Ar).

e) Preparazione dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 5a

Vennero sospesi 5,2 g (0,022 moli) dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 4a in una soluzione di 2,2 g di potassa in 50 ml di metanolo acquoso al 50% in volume, la soluzione venne scaldata a riflusso per un'ora.

Venne eliminato il metanolo per evaporazione sotto vuoto, quindi di diluì

./.



con 150 ml di acqua e dopo lavaggio della soluzione con etere etilico si acidificò la soluzione acquosa con HCl 12 N.

Si formò un precipitato che venne filtrato ed essiccato ottenendo 4,8 g di prodotto (resa 97%).

- 5 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,8-1,95 (1H,m, CHHCHCOOCH_3); 2,1-2,25 (1H,m, CHHCHCOOCH_3); 2,65-2,85 (3H,m, $\text{PhCH}_2\text{CHCOOCH}_3$, CHCOOCH_3); 2,95 (2H,d, PhCHCH); 3,82 (3H,s, PhOCH_3); 6,6 (1H,d,Ar); 6,8 (1H,d,Ar).

f) Preparazione della (R,S)-2-ammino-6-metossi-7-fluoro-tetralina cloridrato
 10 (ST 1262) 6a

Vennero sciolti 4,11 g (0,018 moli) dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 5a in 9 ml di cloruro di tionile sotto corrente di azoto, la soluzione venne scaldata a 60°C per quattro ore, quindi si aggiunse toluene concentrando più volte sotto vuoto.

- 15 Si ottenne un olio verde che venne sciolto in 12 ml di acetone anidro e gocciolato in una soluzione di 1,75 g (0,024 moli) di sodio azide in 12 ml di acqua, raffreddando la miscela di reazione a 0°C. Si lasciò reagire sotto agitazione per mezz'ora lasciando salire la temperatura a 20°C, quindi si raffreddò di nuovo a 0-5°C e si aggiunsero 150 ml di acqua.

- 20 Venne quindi filtrato sotto vuoto il precipitato formatosi che fu lasciato essiccare sottovuoto ottenendo 3.9 g di azide acida.

Questo prodotto venne sciolto in 12 ml di toluene e scaldato per un'ora a 100°C, il solvente venne eliminato ottenendo un olio denso a cui vennero aggiunti 10 ml di alcool benzilico anidro e scaldato di nuovo a 100°C per 6 ore.

- 25 La soluzione venne raffreddata a 5°C per una notte, quindi venne filtrato il

./.

precipitato formatosi che venne essiccato ottenendo 4,7 g di carbobenzossiderivato.

Questo prodotto venne solubilizzato scaldando leggermente in 350 ml di etanolo anidro, si acidificò con circa 2 ml di HCl concentrato e si aggiunsero 500 mg di palladio su carbone, la miscela così ottenuta fu sottoposta in Parr ad idrogenazione sotto una pressione di 50 p.s.i. di idrogeno per 5 ore.

Si filtrò il catalizzatore su celite lavando più volte con etanolo caldo, il solvente venne eliminato sotto vuoto ed il solido così ottenuto cristallizzato da una miscela di metanolo/etere etilico (resa 58%).

10 P.F.: decompone a 230°C

¹H-NMR (DMSO-d₆), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,6-1,8 (1H,m,CHHCHN⁺); 2,0-2,2 (1H,m,CHHCHN⁺); 2,6-3,0(4H,m,PhCH₂CH₂,PhCH₂CHN⁺); 3,8 (3H,s,OCH₃); 6,8-7,0(2H,2d,Ar)

ESEMPIO 6 (Schema 2)

15 g) Preparazione della (R,S)-2-ammino-6-idrossi-7-fluoro-tetralina cloridrato (ST 1267) 7

Vennero sospesi 0,6 g (0,0026 moli) della (R,S)-2-ammino-6-metossi-7-fluoro-tetralina cloridrato 6a in 8 ml di acido bromidrico al 47% in acqua, quindi si scaldò a 130°C per una notte.

20 Si eliminò l'acqua per evaporazione sotto vuoto, quindi il solido scuro venne sciolto in metanolo acquoso al 50% in volume ed eluito su una colonna di 20 ml di resina A-21 in forma basica.

La soluzione eluita venne acidificata a pH 2 con acido cloridrico 3N, concentrata sotto vuoto ed eluita su una colonna di 20 ml di resina A-21 in forma cloridrata.

25

./.

Venne quindi eliminato molto bene il solvente per concentrazione sotto vuoto. Si trattò quindi il solido con acetone, dopo averlo filtrato si cristallizzò da metanolo per aggiunta di etere etilico ottenendo 350 mg di prodotto (resa 62%). P.F.: decompone a circa 200°C.

- 5 $^1\text{H-NMR}$, (CD_3OD), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,7-1,9 (1H,m, CHHCHN^+); 2,1-2,3 (1H,m, CHHCHN^+); 2,7-3,1 (4H,m, PhCH_2CH_2 ; $\text{PhCH}_2\text{CHN}^+$); 3,4-3,6 (1H,m, CHN^+); 6,6-6,85 (2H,2d,Ar).

ESEMPIO 7 (Schema 2)

Preparazione della (R,S)-2-ammino-6-metil-7-acetil-tetralina cloridrato (ST 1274) 10

a) Preparazione dell'acido 4-(6-metil-fenil)-3-carbometossi-3-butenico 1b

15 La preparazione è analoga a quella dell'acido 4-(6-metossi-7-fluorofenil)-3-carbometossi-3-butenico 1a, usando come composto di partenza la p-tolualdeide, tre ore come tempo di reazione a riflusso e una miscela di cicloesano e acetato di etile come solvente di cristallizzazione (resa 27%).

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$; Varian 200 MHz, δ (p.p.m.): 2,35 (3H,s, PhCH_3); 3,58 (2H,s, CH_2COOH); 3,83 (3H,s, COOCH_3); 7,15-7,3 (4H,m, Ar); 7,87 (1H,s, $\text{CH}=\text{C}$).

b) Preparazione dell'acido 4-(6-metilfenil)-3-carbometossi-3-butanoico 2b

20 La preparazione è analoga a quella dell'acido 4-(6-metossi-7-fluorofenil)-3-carbometossi-3-butanoico 2a, usando come composto di partenza l'acido 1b, 2 ore e mezza come tempo di idrogenazione (resa 94%).

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$, Varian 200 MHz, δ (p.p.m.): 2,23 (1H,s, PhCH_3); 2,28-2,45 (1H,m, CHCOOCH_3); 2,55-2,75 (2H,m, CH_2COOH); 2,9-3,1 (2H,m, PhCH_2); 3,62 (3H,s, COOCH_3); 6,9-7,1 (4H,m,Ar)

c) Preparazione dell'estere metilico dell'acido (R,S)-6-metil-4-oxo-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 3 b

La preparazione è analoga a quella dell'estere metilico dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-4-oxo-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 3a, usando l'acido 2b come
5 composto di partenza (resa 96%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 200 MHz, δ (p.p.m.): 2,35 (3H,s, PhCH_3); 2,7-2,9(2H, m, PhCH_2); 3,1-3,2 (3H,m, $\text{PhCOCH}_2\text{CHCOOCH}_3$); 3,7 (3H,s, COOCH_3); 7,1-7,35 (2H,m,Ar); 7,8 (1H,s,Ar).

10 d) Preparazione dell'estere metilico dell'acido (R,S)-6-metil-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 4b

La preparazione è analoga a quella dell'estere metilico dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 4a, usando l'estere metilico 3b come composto di partenza (resa 98%).

15 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 200 MHz), δ (p.p.m.): 1,7-1,95 (1H,m, CHHCHCOCCl_3); 2,1-2,3 (1H,m, CHHCHCOOCH_3); 2,3 (3H,s, PhCH_3); 2,6-2,85 (3H,m, $\text{PhCH}_2\text{CHCOOCH}_3$, CHCOOCH_3); 2,9-3,0 (2H,d, PhCH_2CH_2); 3,72 (3H,s, COOCH_3); 6,85-7,1 (3H,m,Ar)

h) Preparazione dell'estere metilico dell'acido (R,S)-6-metil-7-acetil-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 8

20 Vennero sciolti in 30 ml di cloruro di metilene 3,8 g (0,0186 moli) dell'estere metilico dell'acido (R,S)-6-metil-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 4b, a questa soluzione raffreddata a 5°C sotto corrente di azoto si aggiunsero 5,2 g di tricloruro di alluminio e quindi vennero gocciolati alla stessa temperatura e sotto agitazione 1,6 ml di cloruro di acetile.

25 Dopo aver fatto reagire a temperatura ambiente per un'ora e mezza, si

./.

aggiunse molto lentamente, sotto agitazione e raffreddando, 100 ml di acqua ghiacciata, la soluzione venne estratta più volte con 100 ml totali di cloruro di metilene lavando più volte con acqua fredda.

La fase organica venne anidrificata con solfato anidro di sodio, il solvente
5 eliminato sotto vuoto ottenendo un solido scuro, che seccato fornì 3,8 g di prodotto grezzo che venne cromatografato su colonna di 50 g di silice usando come eluente n-esano/acetato di etile 8 : 2.

Il solvente delle frazioni fu eliminato per evaporazione sotto vuoto ottenendo 1,8 g di prodotto (resa 40%)

10 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1,78-2,0 (1H,m, CHHCHCOCOOCH_3); 2,1-2,3 (1H,m, CHHCHCOOCH); 2,45 (3H,s, COCH_3); 2,55 (3H,s, PhCH_3); 2,65-2,85 (3H,m, PhCHCHCOOCH , CHCOOCH_3); 2,95 (2H,d, PhCH_2CH_2); 6,95 (1H,s,Ar); 7,45 (1H,s,Ar).

i) Preparazione dell'acido (R,S)-6-metil-7-acetil-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 9

15 La preparazione è analoga a quella dell'acido (R,S)-6-metossi-7-fluoro-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 5, usando l'estere metilico 8 come composto di partenza, un'ora e mezza la temperatura di reazione a riflusso e una miscela n-esano/acetato di etile per la cristallizzazione (resa 82%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 2,78-2,92 (1H,m, CHHCHCOOH);
20 2,1-2,25 (1H,m, CHHCHCOOH); 2,4 (3H,s, COCH_3); 2,5 (3H,s, PhCH_3); 2,7-2,9 (3H,m, $\text{PhCH}_2\text{CHCOOH}$, CHCOOH); 2,9-3,0 (2H, d, PhCH_2CH_2); 6,9 (1H,s,Ar); 7,4 (1H,s,Ar).

l) Preparazione della (R,S)-2-ammino-6-metil-7-acetil-tetralina cloridrato (ST 1274) 10

25 Vennero sospesi in 40 ml di acetone anidro 6,5 g (0,028 moli) dell'acido



(R,S)-6-metil-7-acetil-1,2,3,4-tetraidro-2-naftoico 9 e alla sospensione gocciolati lentamente 4,3 ml (0,0307 moli) di trietilammina. Venne quindi portata la temperatura della soluzione a -5°C e gocciolati lentamente 2,95 ml (0,0307 moli) di etilcloroformiato sciolto in 4 ml di acetone.

5 Mantenendo la temperatura a 0°C vennero gocciolati alla soluzione 3,65 g (0,056 moli) di sodio azide sciolti in 80 ml di acqua e sempre a 0°C si lasciò sotto agitazione per un'ora con formazione di un precipitato. Dopo l'aggiunta di altri 80 ml di acqua ghiacciata si estrasse con 100 ml di toluene e la soluzione organica venne anidrificata con sodio solfato anidro.

10 La soluzione venne aggiunta a 30 ml di toluene scaldato a 100°C e il riscaldamento continuato per un'ora e mezza.

Il solvente venne eliminato per evaporazione sotto vuoto ottenendo 4,9 g di un olio denso leggermente colorato che venne sospeso in 50 ml di HCl 8N e scaldato sotto agitazione per un'ora e mezza a 100°C .

15 Il solvente venne eliminato per evaporazione sotto vuoto, vennero quindi aggiunti 100 ml di acqua e sotto agitazione la sospensione portata a pH alcalino (10) con soda 4N raffreddando con bagno di ghiaccio.

20 La soluzione acquosa venne estratta in più porzioni con 120 ml di etere etilico, la fase organica anidrificata con solfato sodico anidro ed alla soluzione eterea così ottenuta venne gorgogliato acido cloridrico gassoso.

Il precipitato così formato venne filtrato sotto vuoto, essiccato all'aria ottenendo 2,3 g di un solido leggermente colorato che venne cristallizzato da una miscela di acetato di etile e metanolo.

25 Si ottennero dopo essiccamento in stufa 2 g di prodotto cristallino incolore (resa 30%).

./.

P.F.: 195-197°C con decomposizione

¹H-NMR, (CD₃OD), Varian 300 MHz, δ (p.p.m.): 1.75-1.85 (1H,m,CH₂CHN⁺); 2,15-2,3 (1H,m,CH₂CHN⁺); 2,42 (3H,s,CH₃CO); 2,53 (3H,s,CH₃Ph); 2,8-3,0(4H,m,PhCH₂CHN⁺),PhCH₂CH₂); 3,5-3,65 (1H,m,CHN⁺); 7,05 (1H,s,Ar); 7,6
5 (1H,s,Ar).

L'approccio metodologico più largamente utilizzato al fine di riuscire a valutare nell'indagine preclinica il possibile effetto protettivo di una sostanza nello shock settico è quello di utilizzare modelli sperimentali di intossicazione da tossina (endo o esotossina), iniettata direttamente nell'animale da laboratorio, o
10 liberata massivamente dalle cellule infettanti inoculate nell'animale.

Nel seguito vengono riportati i risultati ottenuti con alcuni composti secondo l'invenzione, in confronto con ST 626 (R,S)-2-ammino-6-fluoro-7-metossitetralina cloridrato. Come già detto il composto ST 626 è strutturalmente analogo ed ha una attività farmacologica simile ai composti secondo l'invenzione.

Tali risultati provano l'efficacia preventiva e terapeutica dei composti secondo l'invenzione, fornendo altresì indicazioni su uno dei possibili meccanismi di azione: drastica riduzione dei livelli ematici delle citochine infiammatorie (TNF, IL-1β, IL-6, e IFN-γ).
15

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEI COMPOSTI ST 1238, ST 1274 e ST 20 1275 IN MODELLI MURINI DI SHOCK SETTICO.

Sono stati utilizzati topi maschi BALB/c (C. River), di circa sei settimane di età (10 animali per gruppo sperimentale). Gli animali sono stati stabulati in stanze con temperatura costante di 22 ± 2°C e umidità relativa di 50 ± 15% con ciclo di 12 ore di luce (7.00 - 19.00) e 12 di buio (19.00 - 7.00), con mangime ed
25 acqua ad libitum.

./.

Le sostanze utilizzate sono state: LPS (*Escherichia coli* sierotipo O26:B6), lotto 73570 JB (Difco), LPS (*Salmonella typhosa*), lotto 81H4018 (Sigma), SEB (*Staphylococcus aureus*), lotto 144H4024 (Sigma), D-galattosamina lotto 031EE002485 (Merck).

5 I composti saggiati sono stati: ST 1238, ST 1274 e ST 1275.

Il pH delle soluzioni dei composti è stato corretto, quando necessario, con NaOH 0,1N (mantenendo la soluzione a freddo e in continua agitazione) per ottenere valori non inferiori a pH 5,5.

Modello di intossicazione con LPS da *S. typhosa*

10 Gli animali sono stati trattati per via intraperitoneale (i.p.) con LPS da *S. typhosa*. La preparazione di endotossina è stata risospesa in soluzione fisiologica sterile e somministrata in un volume di 200 μ l alla dose di 27 mg/kg, corrispondenti circa ad una DL₈₀.

15 I composti saggiati sono stati somministrati i.v. in 200 μ l di fisiologica, ad una dose corrispondente ad 1/10 delle rispettive DL₅₀, 30 minuti prima e 5 minuti dopo il trattamento con LPS.

Modello di intossicazione con LPS (da *E. coli*) in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

20 Gli animali sono stati sensibilizzati con D-galattosamina (1000 mg/kg, i.p.), e contemporaneamente hanno ricevuto l'LPS da *E. coli* (0,3 mg/kg, i.p.), in un volume totale di 200 μ l. La dose di LPS utilizzata corrisponde circa alla DL₈₀ dell'endotossina nell'animale sensibilizzato con D-galattosamina.

25 I composti saggiati sono stati somministrati i.v. in 200 μ l di fisiologica, ad una dose corrispondente ad 1/10 delle rispettive DL₅₀, 30 minuti prima e 5 minuti dopo, oppure 5 e 30 minuti dopo il trattamento con LPS.

./.

Modello di intossicazione con SEB (enterotossina stafilococcica) in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

Gli animali sono stati sensibilizzati con D-galattosamina (1000-1500 mg/kg, i.p.), e contemporaneamente hanno ricevuto l'enterotossina SEB (3 mg/kg, i.p.) in un volume totale di 200 μ l. La dose di SEB utilizzata corrisponde circa alla DL₈₀ ed è stata determinata in un esperimento preliminare.

I composti saggiati sono stati somministrati i.v. in 200 μ l di fisiologica, ad una dose corrispondente ad 1/10 delle rispettive DL₅₀, 30 minuti prima e 5 minuti dopo, oppure 5 e 30 minuti dopo il trattamento con SEB.

In tutti gli esperimenti gli animali sono stati osservati per un periodo di 10 giorni, prendendo quotidianamente nota degli eventuali decessi.

La significatività dell'effetto protettivo dei composti testati è stata valutata mediante test esatto di Fisher ad una coda.

RISULTATI

Modello di intossicazione con LPS da *S. Typhosa*.

Un'effetto protettivo statisticamente significativo è stato conseguito con entrambi i composti ($p < 0,01$ per ST 1274 e $p < 0,05$ per ST 1275) somministrati secondo un protocollo di trattamento pre- e post-challenge (Tab. 1).



Tab. 1 Effetto protettivo di ST 1274 e ST 1275 nel modello di shock settico da LPS di *Salmonella typhosa* nel topo. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo LPS ST 626 (6 mg/kg, i.v.)	14/20 6/20	+40	<0,05
Controllo LPS ST 1274 (5,5 mg/kg, i.v.)	18/20 10/20	— +40	— <0,01
Controllo LPS ST 1275 (4 mg/kg, i.v.)	10/10 6/10	— +40	— <0,05

a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

Modello di intossicazione con LPS da *E. Coli* in animali sensibilizzati con D-galattosamina

Con entrambi i protocolli temporali di trattamento adottati, il composto ST 1238 risulta in grado di ridurre la mortalità degli animali in modo significativo ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) (Tab. 2 e 3). Viceversa, i composti ST 1274 e ST 1275 incrementano la percentuale di sopravvivenza, ma in modo non significativo (20%), dopo somministrazione pre- e post-challenge (Tab. 2).

Tab. 2 Effetto protettivo di ST 1238, ST 1274 e ST 1275 nel modello di shock settico da LPS di *Escherichia coli* nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo LPS + D-GalN ST 626 (6 mg/kg, i.v.)	25/29 21/28	+11	ns
Controllo LPS + D-GalN ST 1238 (18 mg/kg, i.v.)	17/20 5/20	— +60	— <0,001
Controllo LPS + D-GalN ST 1274 (5,5 mg/kg, i.v.)	7/10 5/10	— +20	— n.s.
Controllo LPS + D-GalN ST 1275 (4 mg/kg, i.v.)	7/10 5/10	— +20	— n.s.

a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

Tab. 3 Effetto protettivo di ST 1238 nel modello di shock settico da LPS di *Escherichia coli* nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento post-challenge (+5' e +30').

5	Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
	Controllo LPS + D-GalN	16/20	—	—
	ST 1238 (18 mg/kg, i.v.)	7/19	+44	<0,01

10 **Modello di intossicazione con enterotossina SEB in animali sensibilizzati con D-galattosamina.**

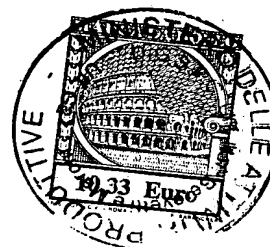
In questo modello tutti i composti determinano un consistente incremento del numero degli animali sopravvissuti rispetto al controllo (70% - 90%), se somministrati 30 minuti prima e 5 minuti dopo il challenge (Tab. 4). Eseguendo
15 il solo trattamento post-challenge con ST 1238 si osserva ancora un effetto protettivo estremamente significativo ($p < 0,001$) (Tab. 5).

Tab. 4 Effetto protettivo di ST 1238, ST 1274 e ST 1275 nel modello di shock settico da enterotossina SEB nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

5	Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
	Controllo SEB + D-GalN	15/20	—	—
	ST 1238 (18 mg/kg, i.v.)	1/20	+70	<0,001
10	Controllo SEB + D-GalN	9/10	—	—
	ST 1274 (5,5 mg/kg, i.v.)	0/10	+90	<0,001
	Controllo SEB + D-GalN	9/10	—	—
	ST 1275 (4 mg/kg, i.v.)	1/10	+80	<0,01

15 a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.



Tab. 5 Effetto protettivo di ST 1238 nel modello di shock settico da enterotossina SEB nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento post-challenge (+5' e +30').

5	Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
	Controllo SEB + D-GalN	18/20	—	—
	ST 1238 (18 mg/kg, i.v.)	4/20	+70	<0,001

10 a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

15 **EFFETTO DI ST 1238 SULLA PRODUZIONE DI TNF INDOTTA DA LPS IN
COLTURE DI SANGUE INTERO DI RATTO.**

Le colture di sangue intero stimulate con LPS sono state negli ultimi tempi utilizzate come sistema sperimentale che, sebbene con alcune limitazioni, mima la condizione fisiopatologica della endotossinemia, situazione in cui il lipopolisaccaride dei batteri Gram negativi è rilasciato in circolo, venendo così a contatto con le cellule del sistema immune. Di recente, infatti, questo sistema sperimentale è stato adottato per lo studio di potenziali inibitori del rilascio di TNF e IL-1 (GC Rice et al., *Shock*, 4:254-266, 1994. AJH Gearing et al., *Nature*, 370:555-557, 1994. K Tschaikowsky, *Biochim Biophys Acta*, 1222:113-121, 1994.

25 A Haziot et al, *J Immunol*, 152:5868-5876, 1994).

./.

Sono stati utilizzati ratti Wistar maschi (C. River) di 175-200 grammi. Gli animali sono stati stabulati in stanze aventi temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidità relativa di $50 \pm 15\%$, luce ciclata di 12 ore di luce (7.00-19.00), mangime e acqua *ad libitum*.

5 Il composto saggiato è stato: ST 1238.

La sostanza utilizzata è stata: LPS (*Salmonella typhosa*) lotto 81H4018.

Trattamento dei campioni ematici

10 Il sangue, prelevato da ratti Wistar sacrificati mediante decapitazione, è stato raccolto in provette di polipropilene (0,450 ml/provetta) contenenti eparina come anticoagulante. I composti da saggiare sono stati dapprima disciolti in soluzione fisiologica sterile. Successivamente volumi pari a 0,025 ml di soluzioni concentrate 20x dei composti in esame sono stati aggiunti alle provette contenenti i campioni ematici, così da avere concentrazioni finali pari a 0,050 mM. Dopo una incubazione di 1h a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 , alle provette
15 sono stati aggiunti 0,025 ml di una soluzione concentrata 20x di LPS di *S. typhosa*, in modo da avere una concentrazione finale di LPS pari a $1 \mu\text{g/ml}$. Dopo una ulteriore incubazione di 4 h, nelle stesse condizioni sopramenzionate, le provette sono state centrifugate 5 min a 10.000 rpm e i supernatanti sono poi stati stoccati e congelati a -80°C in attesa del dosaggio di TNF.

20 Saggio biologico del TNF

Si effettuano, utilizzando terreno RPMI addizionato con 1% FCS, diluizioni seriali dei campioni contenenti TNF direttamente nelle micropiastre Primaria, lasciando 50 μl /pozzetto di ogni diluizione allestita.

25 Si aggiungono alle diluizioni dei campioni 50 μl /pozzetto di una soluzione madre di Actinomicina D-mannitolo ($4 \mu\text{g/ml}$) preparata in terreno RPMI

./.

addizionato con 1% FCS. Questo inibitore consente di amplificare la sensibilità delle cellule al TNF.

Si distribuiscono in ogni pozzetto 100 μ l di una sospensione cellulare di L929 (fibrosarcoma murino sensibile all'azione tossica del TNF) standardizzata a 4×10^5 cell./ml. Si allestiscono gli appropriati controlli, vale a dire il controllo Actinomicina D (cellule+Actinomicina ma senza TNF) e il controllo cellule (cellule in presenza del solo terreno colturale).

Si incubano le piastre per 18 ore a 37°C e 5% CO₂.

Si prepara una miscela colorante contenente XTT (1 mg/ml) e PMS (125 μ M) secondo le modalità sotto riportate. L'XTT viene sciolto (1 mg/ml) in RPMI caldo (60 °C). La soluzione madre di PMS è 100 mM (stabile per circa 20 giorni a +4°C e al buio) e viene preparata sciogliendo il PMS in PBS e sonicando brevemente per portare in soluzione il PMS in modo completo. La soluzione 100 mM di PMS viene quindi diluita 1:800 in XTT, ottenendosi così una concentrazione finale di PMS pari a 125 μ M in XTT 1 mg/ml. La miscela colorante XTT-PMS deve essere filtrata prima dell'uso.

Terminata l'incubazione di 18 ore, si aggiungono a tutti i pozzetti 50 μ l della miscela colorante XTT-PMS, ottenendo così un volume finale di 250 μ l/pozzetto con concentrazioni finali di XTT e PMS pari a 0,2 mg/ml e 25 μ M rispettivamente. Viene allestito anche un "bianco", costituito da pozzetti contenenti 200 μ l di terreno colturale + 50 μ l della miscela XTT-PMS.

Si incubano le piastre per 2-2,5 ore a 37°C e 5% CO₂ (tempo totale di incubazione = 20 ore circa).

Si leggono i valori di assorbanza dei campioni al lettore colorimetrico per micropiastre (*microtiter plate reader*) utilizzando la lunghezza d'onda di lettura a

./.

450 nm e la lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm (programmando il lettore colorimetrico per la sottrazione automatica dei valori di assorbanza del "bianco").

Il titolo del TNF viene calcolato come segue. Per definizione, 1 unità di attività biologica è data dal valore semimassimale (=50%) di assorbanza del controllo Actinomicina D.

Le diluizioni dei campioni generano una curva di valori di assorbanza la cui porzione lineare è descritta dall'equazione $y=ax + b$. Dopo aver inserito i valori di a e b (ottenuti dall'analisi di regressione lineare effettuata al computer) e dopo aver sostituito la y con il valore di assorbanza semimassimale (che corrisponde ad 1 unità biologica) del controllo Actinomicina D, si risolve l'equazione rispetto alla x, che rappresenta il reciproco delle diluizioni del campione. Il valore ottenuto fornisce il titolo di TNF espresso in U/ml.

La valutazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il test t di Student a due code.

RISULTATI

I risultati ottenuti (Tab. 6) indicano che il composto ST 1238 ha ridotto del 39% la produzione di TNF dalle colture ematiche stimolate con LPS.



Tab. 6 Effetto di ST 1238 sulla produzione di TNF da parte di colture di sangue di ratto (n=5) stimulate con LPS di *S. typhosa* (1 µg/ml). Il composto è stato saggiato a una concentrazione di 50 µM. Le condizioni sperimentali sono quelle riportate nei Materiali e Metodi.

Trattamento	TNF (Valori % medi)	Dev. Std.	p*
LPS	100	0	-
LPS+ST 1238	61	25	<0,01

* Test t di Student a due code.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI ST 1238 SUI LIVELLI CIRCOLANTI DI TNF IN DUE MODELLI MURINI DI SHOCK.

Sono stati utilizzati topi maschi BALB/c (C. River), di circa sei settimane di età (10 animali per gruppo sperimentale). Gli animali sono stati stabulati in stanze con temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidità relativa di $50 \pm 15\%$ con ciclo di 12 ore di luce (7.00 - 19.00) e 12 di buio (19.00 - 7.00), con mangime ed acqua ad libitum.

Il composto saggiato è stato: ST 1238.

Le sostanze utilizzate sono state: LPS (*Escherichia coli* sierotipo O26:B6), lotto 73570 JB (Difco), SEB (*Staphylococcus aureus*), lotto 144H4024 (Sigma), D-galattosamina lotto 031EE002485 (Merck).

Modello di intossicazione con LPS (da *E. coli*) in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

Le condizioni sperimentali sono esattamente quelle descritte precedentemente.

./.

Modello di intossicazione con SEB (enterotossina stafilococcica) in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

Le condizioni sperimentali sono esattamente quelle descritte precedentemente.

5 Prelievi ematici

I prelievi ematici sono stati effettuati 90 minuti dopo il challenge (picco ematico del TNF). Il sangue è stato prelevato dal plesso retro-orbitale degli animali, precedentemente anestetizzati mediante breve inalazione con etere. I campioni ematici sono stati incubati 2 ore a temperatura ambiente ed il siero così
10 ottenuto è stato quindi centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti prima di essere congelato a -80°C in attesa del dosaggio.

Saggio biologico del TNF

Sono state effettuate, utilizzando terreno RPMI addizionato con 1% FCS, diluizioni seriali dei campioni ematici direttamente nelle micropiastre Primaria,
15 lasciando 50 µl/pozzetto di ogni diluizione allestita.

Si procede quindi come descritto precedentemente.

La valutazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il test t di Student a una coda.

RISULTATI

20 Modello di intossicazione con LPS da *E. coli* in animali sensibilizzati con D-Galattosamina.

I risultati ottenuti nel modello di shock con LPS da *E. coli* in animali sensibilizzati con D-Galattosamina sono riportati nella Tab 7. Il composto ST 1238 riduce in modo estremamente significativo il rilascio di TNF, con
25 entrambi gli schemi temporali di trattamento ($p < 0,008$ e $p < 0,0001$).

./.

Tab. 7 Valutazione dei livelli serici di TNF dopo somministrazione di ST 1238 (18 mg/kg, iv) nel modello di shock settico da LPS di *Escherichia coli* nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5') e post-challenge (+5' e +30').

	Protocollo -30' e +5'			Protocollo +5' e +30'		
	TNF (U/ml)			TNF (U/ml)		
Trattamento	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
Controllo LPS* ST 626 (6 mg/kg, i.v.)	154,2 35,0	41,0 10,0	<0,01			
Controllo LPS + D-GalN ST 1238	13,6 0,4	4,7 0,2	<0,008	18,1 2,2	1,8 0,6	0,0001

* Modello di intossicazione effettuato con LPS di *S. typhosa*.

Modello di intossicazione con enterotossina SEB in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

I risultati ottenuti nel modello di shock con enterotossina SEB in animali sensibilizzati con D-Galattosamina (Tab. 8) evidenziano come il composto ST 1238 sia in grado di causare un decremento estremamente rilevante dei livelli circolanti di TNF, sia nel trattamento pre- e post-challenge ($p < 0,0001$) che nel trattamento unicamente post-challenge ($p < 0,0002$).

Tab. 8 Valutazione dei livelli serici di TNF dopo somministrazione di ST 1238 (18 mg/kg, iv) nel modello di shock settico da enterotossina SEB nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento effettuato ai tempi -30' e +5' oppure ai tempi +5' e +30' rispetto al challenge.

Trattamento	Protocollo -30' e +5' TNF (U/ml)			Protocollo +5' e +30' TNF (U/ml)		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
Controllo SEB + D-GalN	240,9	49,4		240,9	49,4	
ST 1238	6,2	3,0	0,0001	27,0	3,9	0,0002

**VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI ST 1238 SUI LIVELLI CIRCOLANTI
DI INTERLEUCHINA-1BETA (IL-1 β), INTERLEUCHINA-6 (IL-6) ed
INTERFERON-GAMMA (IFN- γ) NEL TOPO INTOSSICATO CON
ENTEROTOSSINA SEB.**

Sono stati utilizzati topi maschi BALB/c (C. River), di circa sei settimane di età (10 animali per gruppo sperimentale). Gli animali sono stati stabulati in stanze con temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidità relativa di $50 \pm 15\%$ con ciclo di 12 ore di luce (7.00 - 19.00) e 12 di buio (19.00 - 7.00), con mangime ed acqua ad libitum.

Il composto saggiato è stato: ST 1238.

Le sostanze utilizzate sono state: SEB (*Staphylococcus aureus*), lotto 144H4024 (Sigma), D-galattosamina lotto 031EE002485 (Merck).

Il modello di intossicazione con SEB (enterotossina stafilococcica) in topi sensibilizzati con D-galattosamina è esattamente quello descritto precedentemente.

Prelievi ematici



I prelievi ematici sono stati effettuati 2 ore dopo il challenge per l'IL-6, 4 ore dopo il challenge per l'IL-1 e 6 ore dopo il challenge per l'IFN- γ . Il sangue è stato prelevato dal plesso retro-orbitale degli animali, precedentemente anestetizzati mediante breve inalazione con etere. I campioni ematici sono stati incubati 2 ore a temperatura ambiente ed il siero così ottenuto è stato quindi centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti prima di essere congelato a -80°C in attesa del dosaggio.

Saggi biologici

I saggi biologici sono stati effettuati seguendo le indicazioni suggerite nei kits impiegati. In particolare è stato utilizzato:

- Mouse IL1 β Immunoassay (MLB00, R&D Systems)
- Mouse IL-6 EIA Kit (8-6706, PerSeptive Diagnostics)
- Mouse IFN- γ EIA Kit (8-6716, PerSeptive Diagnostics).

La valutazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il test t di Student a una coda.

RISULTATI

Il composto ST 1238 modula negativamente e in maniera statisticamente significativa la produzione delle tre citochine infiammatorie saggate ($p < 0,001$ per IL-1 β ; $p < 0,0001$ per IL-6 e $p < 0,01$ per IFN- γ); i risultati sono riportati in Tab. 9.

Tab. 9 Valutazione dei livelli serici di IL-1 β , IL-6 e IFN- γ dopo somministrazione di ST 1238 (19 mg/kg, iv) nel modello di intossicazione con SEB nel topo sensibilizzato con D-galattosamina. Trattamento effettuato ai tempi -30' e +5' rispetto al challenge.

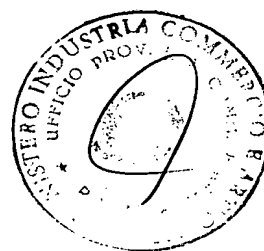
5

10

Trattamento	IL-1beta (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)			IFN-gamma (pg/ml)		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
Controllo SEB + D-GalN	18	4		3493	558		40	3	
ST 1238	0,9	0,5	0,001	599	163	0,0001	25	4	0,01

Roma, 22 settembre 1997

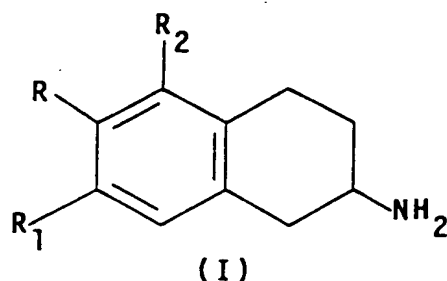
SIGMA TAU
 IND. FARM. RIUNITE s.p.a.
 Viale Shakespeare, 47
 00144 ROMA



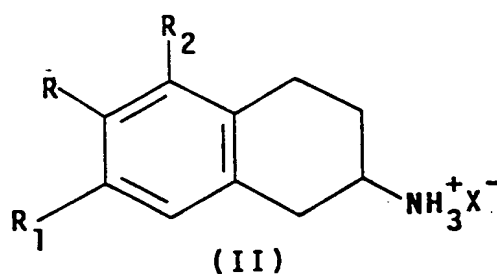
./.

RIVENDICAZIONI

1. 2-amminotetralina di formula generale (I):



10 o suo sale farmacologicamente accettabile di formula generale (II)



in cui:

20 R e R₁, uguali o diversi, sono alogeno, in particolare fluoro; ossidrilie;
alcossi C1-C4, in particolare metossi, eventualmente
sostituito in posizione ω con gruppi OH, NH₂, NR₃R₄, dove
R₃ e R₄, uguali o diversi, sono H, alchile C1-C4, non
sostituito o sostituito in posizione ω con i gruppi OH, NH₂;
alcanoile C1-C4, in particolare acetile;
alchile C1-C4; carbamoile; carbamoilossi; ammino;
25 ammino sostituito NR₃R₄, dove R₃ e R₄ hanno i significati

./.

precedentemente descritti;

R_2 è idrogeno; alogeno, in particolare fluoro; ossidrile; metossi, con la condizione che venga escluso il caso in cui la 2-amminotetralina è un racemo in cui (a) $R = R_1 = CH_3O$; OH ; $R_2 = H$; oppure (b) $R = F$; $R_1 = CH_3O$; OH ; $R_2 = H$; e

X^- è l'anione monovalente di un acido farmacologicamente accettabile.

2. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui l'anione farmacologicamente accettabile è scelto tra cloruro, bromuro, orotato, aspartato acido, citrato acido, fosfato acido, fumarato e fumarato acido, lattato, maleato e maleato acido, ossalato acido, solfato acido, glucosio fosfato, tartrato e tartrato acido.

3. Composto secondo la rivendicazione 1 scelto tra:

S(-)-2-ammino-6-fluoro-7-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1237);

R(+)-2-ammino-6-fluoro-7-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1238);

(R,S)-2-ammino-5,6-difluoro-7-metossi-tetralina cloridrato (ST 1269);

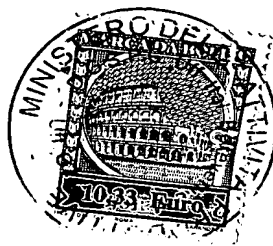
(R,S)-2-ammino-6-fluoro-7-metil-tetralina cloridrato (ST 1275);

(R,S)-2-ammino-7-fluoro-6-idrossi-tetralina cloridrato (ST 1267);

(R,S)-7-acetil-2-ammino-6-metil-tetralina cloridrato (ST 1274);

(R,S)-2-ammino-7-fluoro-6-metossi-tetralina cloridrato (ST 1262).

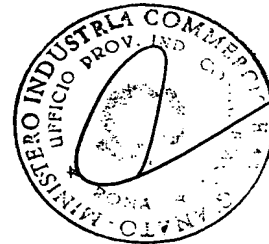
4. Composizione farmaceutica somministrabile per via orale o parenterale comprendente un composto di formula (I) o di formula (II) quale principio attivo e un accipiente farmacologicamente accettabile.



5. Composizione farmaceutica somministrabile per via orale o parenterale per la prevenzione e il trattamento di patologie infiammatorie e/o autoimmuni indotte da citochine infiammatorie, comprendente un composto delle rivendicazioni 1, 2 o 3 come principio attivo ed un eccipiente farmacologicamente accettabile.
- 5 6. Composizione secondo la rivendicazione 5 atta al trattamento profilattico e terapeutico dello shock settico.
7. Composizione secondo la rivendicazione 5 atta al trattamento terapeutico di artrite reumatoide, pancreatite, inflammatory bowel disease, lupus eritematoso sistemico, glomerulonefrite ed encefalomielite.

10 Roma, 22 settembre 1997

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE s.p.a.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA





Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi al brevetto per:

N. 1294931 rilasciato il 23.04.1999 (RM97 A 000568)

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
conservati dall'ufficio.

Roma, li.....

IL FUNZIONARIO

.....

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.